

Andreia Laura P. Rodrigues<sup>1</sup>, Andreas Koschinski<sup>2</sup>, Bruna Lima<sup>1</sup>, Flávia Aguiar<sup>1</sup>, Jader S. Cruz<sup>1</sup>, Manuela Zaccolo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FUMEC University – Belo Horizonte - Brazil, <sup>2</sup>Department of Physiology, Anatomy and Genetics, South Parks Road, Oxford OX1 3QX

O câncer de mama continua sendo a segunda causa mais comum de morte para as mulheres. Um modelo celular comumente usado para investigar o câncer de mama são as células metastáticas. As células metastáticas representam um estágio avançado da patologia que é frequentemente associada a um mau prognóstico. O estudo dos estágios não metastáticos do câncer de mama pode oferecer a possibilidade de descobrir novos insights mecanicistas sobre o desenvolvimento do câncer de mama.

As fosfodiesterases (PDEs) desempenham um papel na proliferação celular e na regulação da progressão do ciclo celular. Embora seu envolvimento no câncer tenha sido reconhecido, pouco se sabe sobre o papel da PDE em diferentes estágios do desenvolvimento do câncer de mama.

As PDEs hidrolisam os nucleotídeos cíclicos adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (cAMP) e guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (cGMP) em sua forma inativa (5'nucleotídeo). Assim, eles desempenham um papel essencial na regulação desses nucleotídeos cíclicos em nível global, bem como em níveis compartimentais ou de microdomínios. Portanto, eles são capazes de modular vias de sinalização intracelular cruciais que podem promover a progressão de células não-metastáticas para câncer metastático. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade das fosfodiesterases em diferentes estágios do desenvolvimento do câncer de mama. Para este objetivo, analisamos três linhas celulares diferentes derivadas de um câncer de mama metastático (células MDA-231), células de câncer de mama não-metastáticas (células MACL-1 e MGSO-3) e células epiteliais mamárias não cancerosas (MCF-10).

Para monitorizar a actividade de PDE nestas diferentes linhas celulares, estabelecemos clones estáveis expressando o repórter de cAMP EPAC1\_camps2 e gerámos as respectivas linhas monoclonais (MDA-231 EPAC C4, MACL-1 EPAC F12 F10, MGSO-3 EPAC D9 e MCF-10 EPAC C10).

Nossos resultados mostram um nível mais baixo de cAMP basal e maior atividade de fosfodiesterases em células metastáticas em comparação com células não-metastáticas e não-cancerígenas. A atividade da PDE8 parece ser mais alta nos estágios metastáticos, enquanto a PDE4 é mais ativa nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer. Para investigar melhor nossas descobertas iniciais, avaliaremos agora o nível de expressão de diferentes fosfodiesterases nessas células.

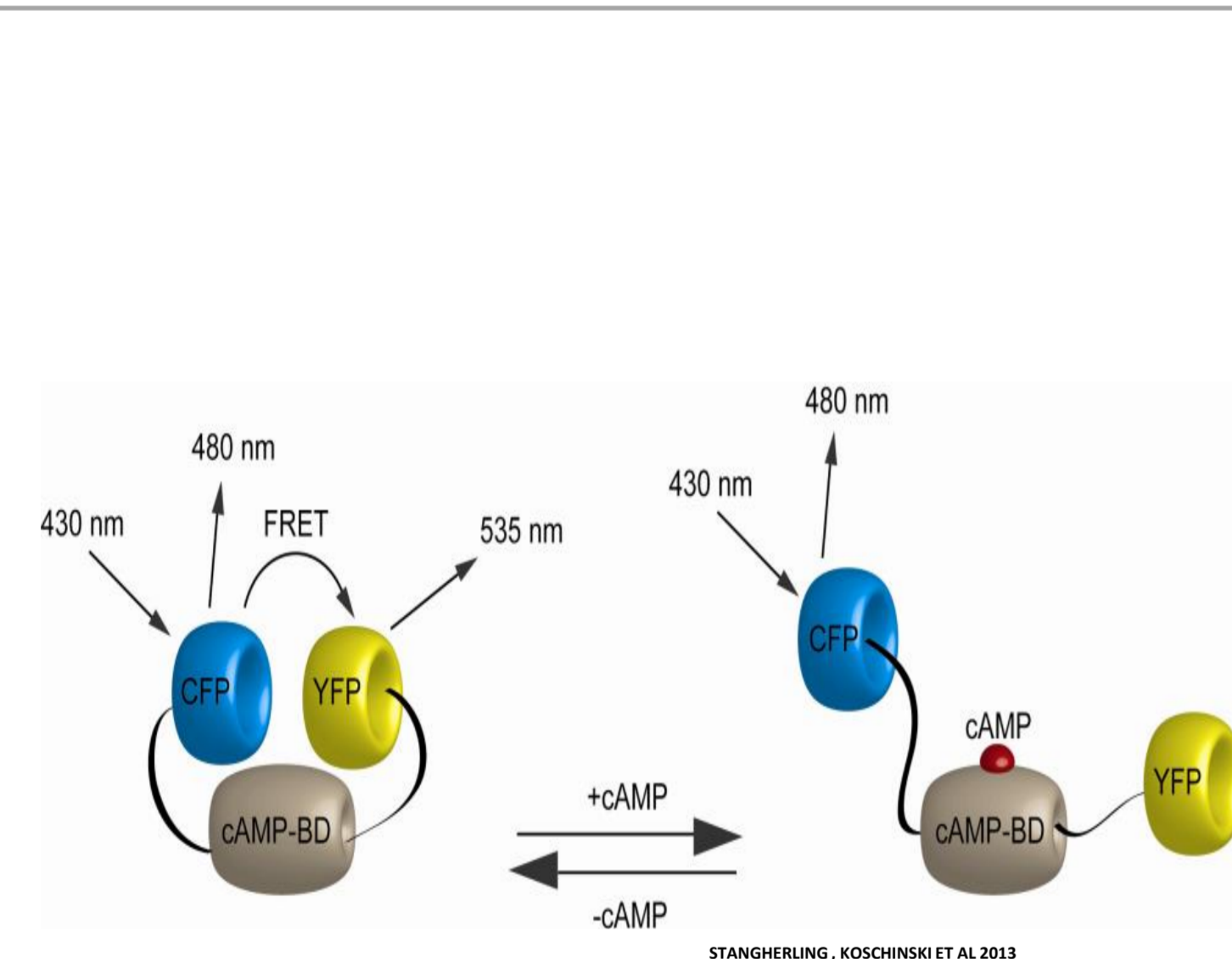
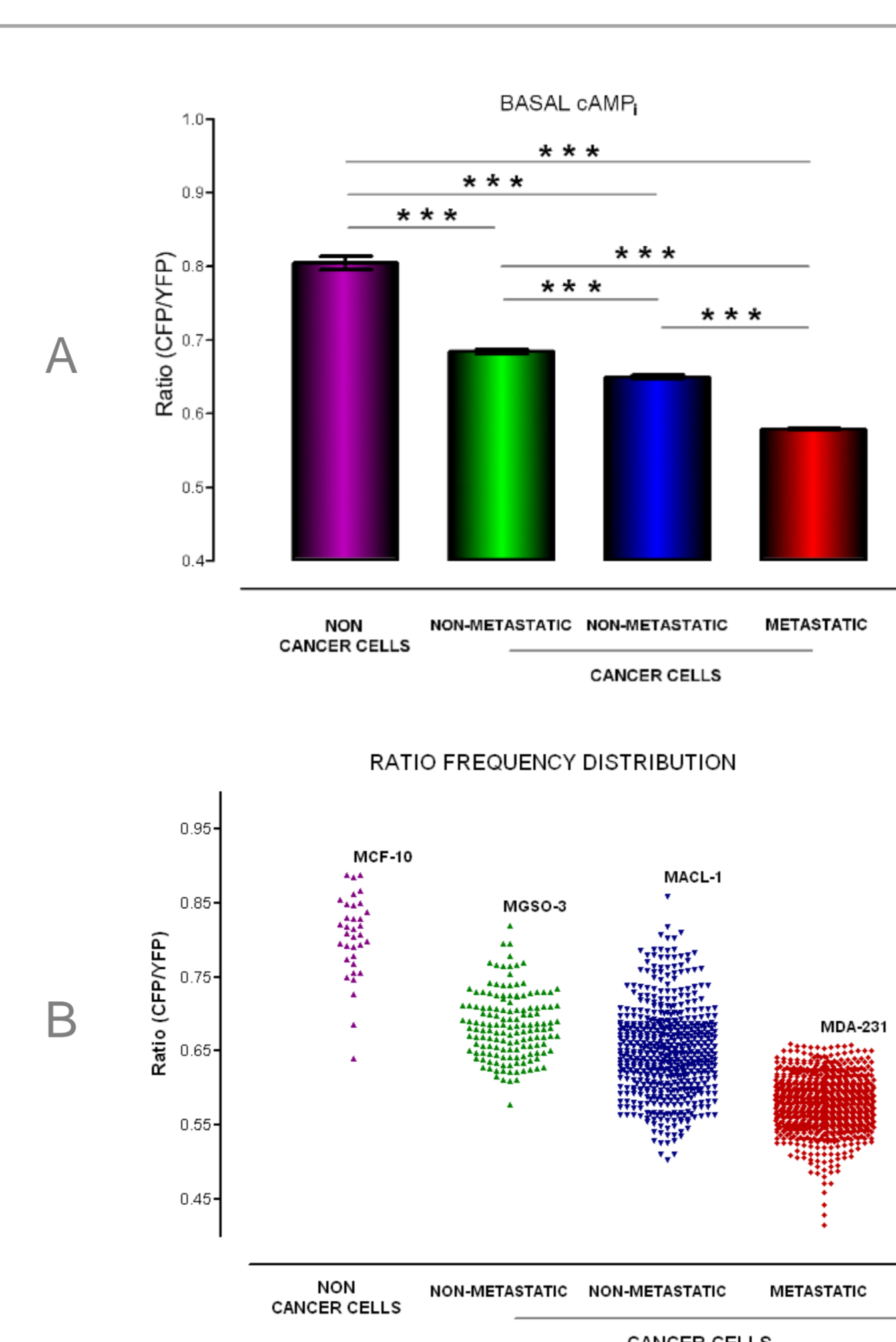
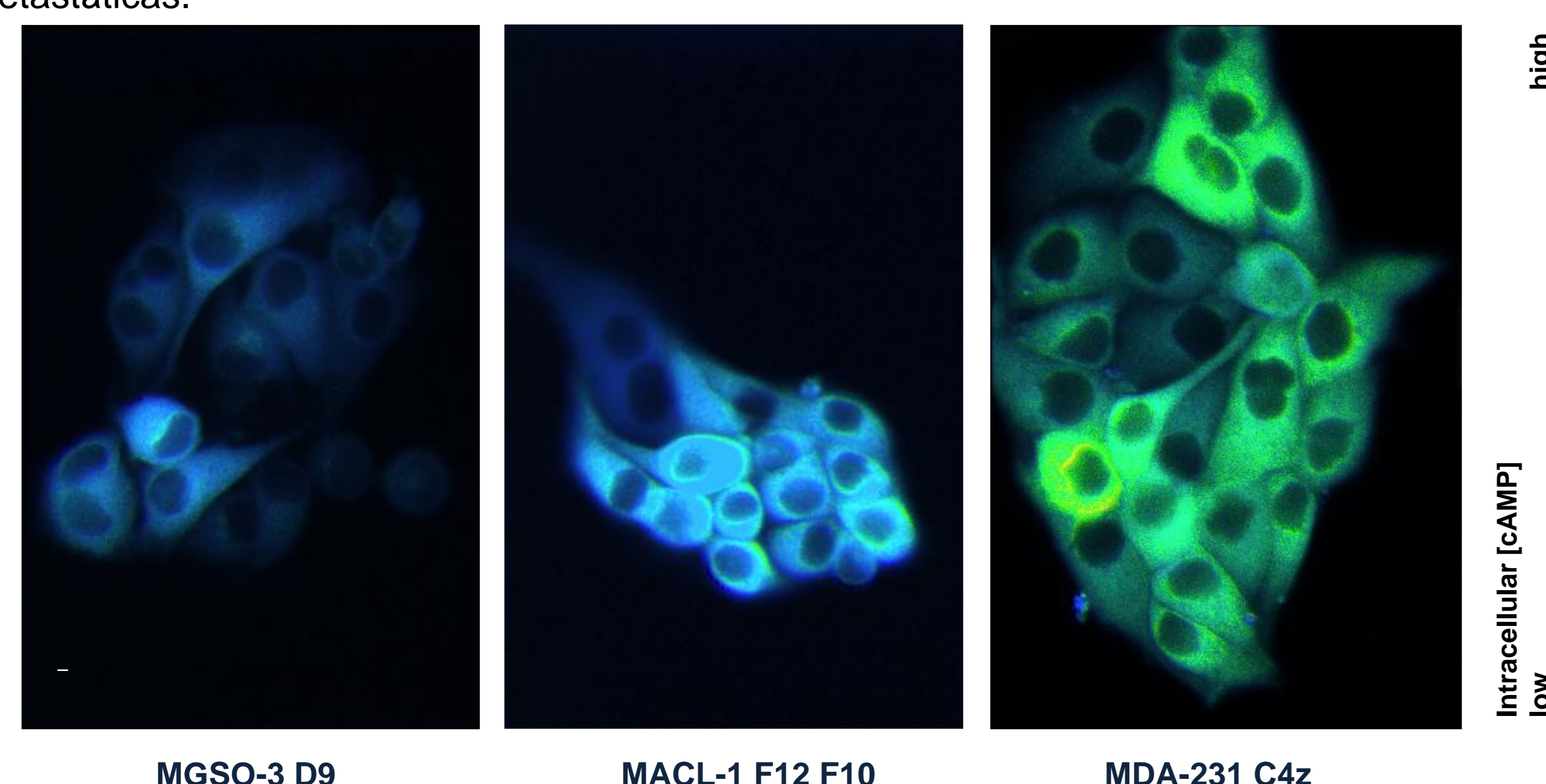


Figura 1

**Figura 1. Representação esquemática do sensor Epac1\_camps:** Epac é um fator de troca de nucleotídeo guanina para Rap1 que é diretamente ativado pela ligação de cAMP. O sensor Epac1 é baseado na fusão de uma Proteína Fluorescente Ciana (CFP) e uma Proteína Fluorescente Amarela (YFP) com o domínio de ligação a cAMP da EPAC. Sem cAMP, EPAC1\_camps mostra transferência de energia de ressonância de fluorescência significativa (FRET), levando a uma eficiente transferência de energia de excitação sem radiação do fluorore ciano para o fluoróforo Amarelo. No entanto, após ligação do cAMP, a posição estérica dos fluoróforos é alterada e a eficiência FRET diminui significativamente. Assim, submetendo-se a uma mudança conformacional induzida por cAMP, os EPAC1\_camps servem como um indicador cAMP altamente sensível em células intactas.

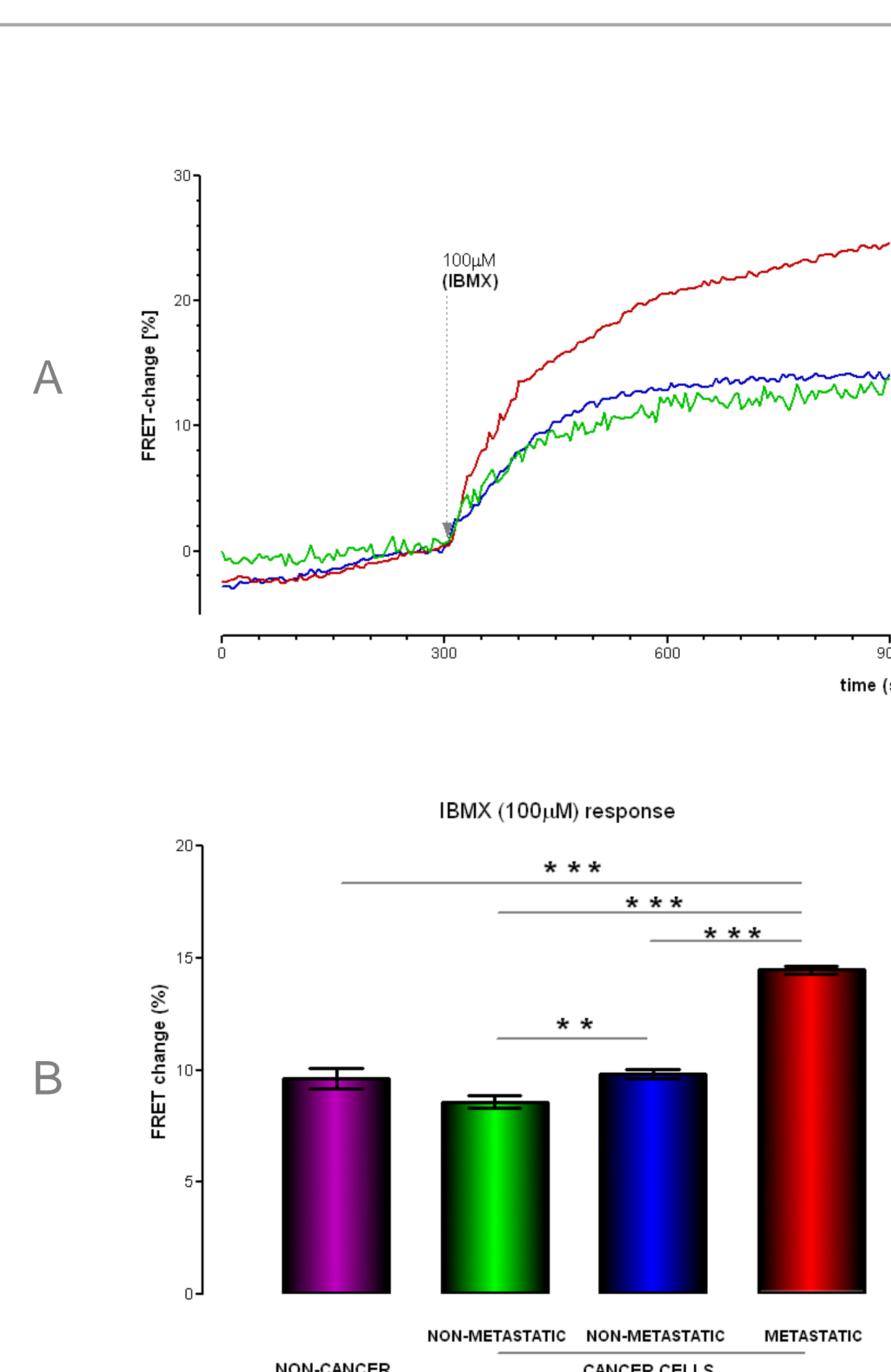
**Figura 2. Imagens de relação FRET representativas de intensidade de Pseudo-colorido (IMD) de células não-metastáticas (MACL-1 F12 F10 e MGSO-3 D9) e metastáticas (MDA-231 C4), expressando de forma estável EPAC1\_camps:** Para investigar o basocelular intracelular [cAMP] calculamos a razão basal das quatro linhas celulares. Por conveniência, calculamos CFP / YFP, de modo que uma menor razão indica níveis intracelulares de cAMP mais baixos e vice-versa. As imagens FRET da população foram adquiridas aleatoriamente e calculadas em valores de razão. Razões típicas estavam na faixa de 0,85 (azul) a 0,4 (vermelho). Os resultados indicam que células não tumorais (controlo) (MCF-10 C10) e células não metastáticas (MGSO-3 e MACL-1) têm uma concentração aumentada de cAMP em comparação com células metastáticas.

Figura 2



**Figure 3. Comparison of basal cAMP-levels in the different epithelial breast cell lines:** As células foram excitadas a 436 nm e a emissão de CFP (480nm) e YFP (535nm) foi registrada. Foi subtraído a intensidade de emissão de CFP e dividido pela respectiva emissão de YFP para gerar a razão FRET. Assim, uma maior taxa de FRET indica um nível de cAMP intracelular mais elevado. Representação em gráfico de barras da concentração basal intracelular de AMPc dos quatro clones. A significância estatística foi avaliada por ANOVA One-Way não paramétrico, incluindo o pós-teste de Bonferoni. \*\*\* = p <0,001

A. Análise de frequência da distribuição da razão das linhagens de células de árvores, mostrando a variabilidade dos níveis intracelulares de AMPc. As células metastáticas mostram claramente um pico em menores taxas de FRET, enquanto as células normais mostram razões comparativamente mais altas. As células cancerosas não metastáticas apresentam níveis intermediários de cAMP intracelular basal.



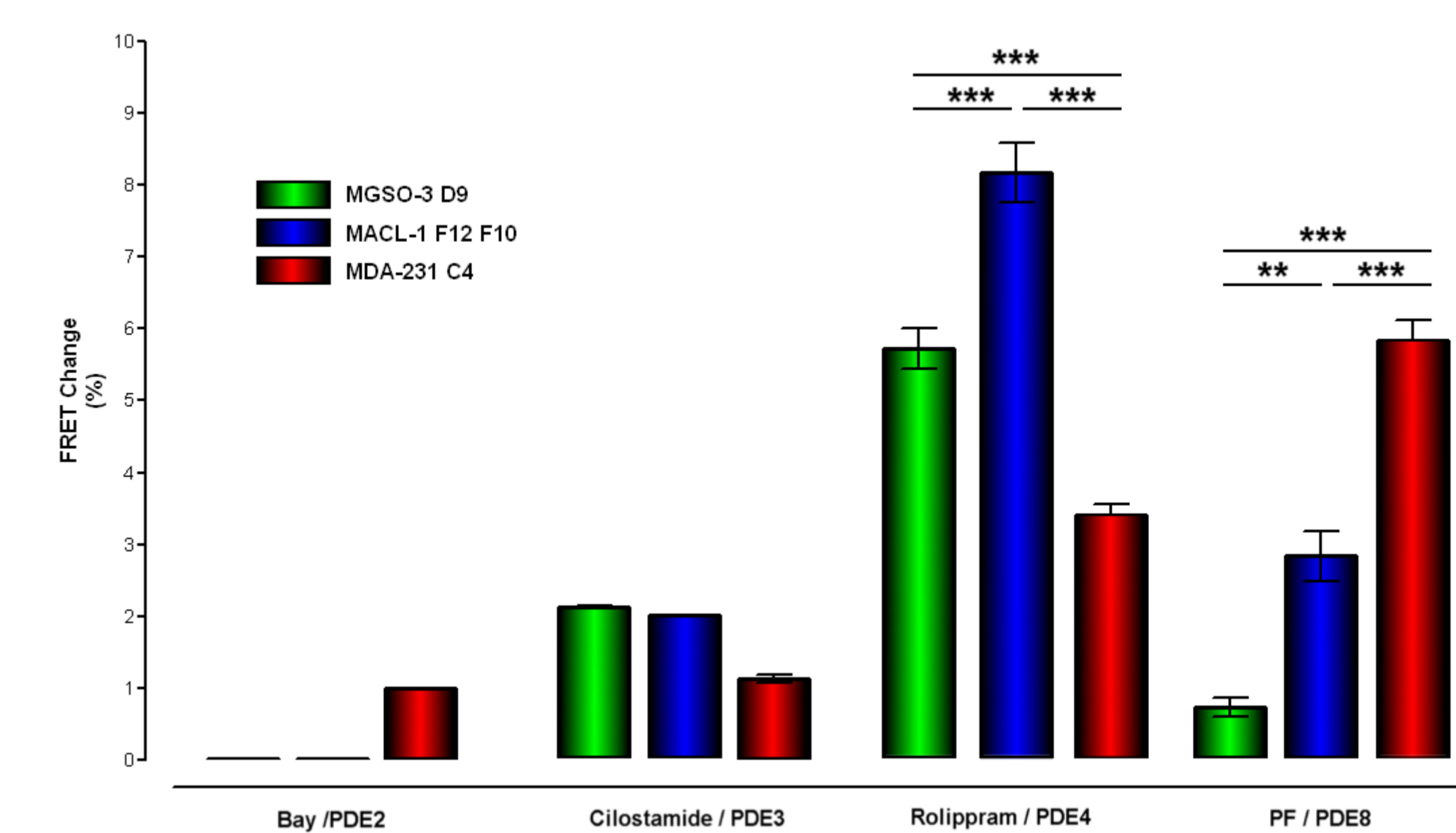
**Figure 4. Comparação da atividade basal da atividade das PDE activity nas diferentes linhagens celulares:** As células foram excitadas a 486 nm, a emiss foi registrada a 480 e 535 nm, respectivamente. Para estabelecer uma linha de base estável, as células foram inicialmente monitoradas por 5 a 10 minutos. No tempo indicado, o inibidor de PDE não selectivo IBMX (100 μM) foi aplicado para avaliar a actividade de PDE basal nas respectivas células. A razão FRET normalizada (Cyan / Yellow) foi calculada antes e depois do tratamento com IBMX e a diferença expressa como mudança de FRET [%]. Os resultados mostram claramente que a atividade de PDE é significativamente aumentada em células metastáticas.

A. Traço representativo dos experimentos e análises.

B. Representação em gráfico de barras da variação FRET (%) das quatro linhas celulares diferentes. A resposta de IBMX foi significativamente diferente (\*\* = p <0,001) entre células metastáticas e não-metastáticas e não-cancerígenas, e ainda significativamente diferente entre as duas linhas celulares não-metastáticas (\*\* = p <0,01).

**Figure 5. Analysis of the contribution of different PDEs to the basal PDE activity in the investigated cell lines:**

Análogo ao traço representativo mostrado em 3A, as células foram inicialmente monitoradas 5 a 10 minutos para estabelecer uma linha de base estável. Depois disso, o respectivo inibidor específico de PDE (Bay-100 nM, PDE2; Cilostamide-1 μM, PDE3; Rolipram-10 μM, PDE4; PF-300 nM, PDE8) foi aplicado. As razs FRET subtrao de fundo (Cyan / Yellow) foram calculadas antes e depois da adio do respectivo bloqueador de PDE selectivo. A diferença foi expressa como alteração FRET [%] normalizada para a relação FRET basal antes da adição.



As células metastáticas mostram uma resposta significativamente maior (p <0,001) ao PF e menor (p <0,001) ao Rolipram em comparação com as células não metastáticas, sugerindo que as células metastáticas têm PDE8- e menor atividade de PDE4 significativamente maior do que as células não metastáticas.

## CONCLUSÕES:

Os níveis de cAMP basal intracelular diminuem das células não tumorais para as tumorais metastáticas.

- Níveis baixos de cAMP correlaciona com atividade aumentada de PDE activity nas células metastáticas. Entretanto, a razão dos baixos níveis de cAMP nas células metasticas permanece por ser investigado.
- Diferentes PDEs estão ativas nas diferentes linhagens celulares .

Referências:

- Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. J Biol Chem 279:37215–37218
- CORREA, C. R.; BERTOLLO, C. M.; GOES, A. M. Establishment and Characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. Oncol Res, New York, v. 17, n. 10, p. 473-482, 2009.